

Glikozil-azidok szerepe az anomer szénatomhoz nitrogénnel kötődő funkciós csoportok kialakításában

OTKA T043550 számú kutatási pályázat
(2003-2006. – 6.6 MFt)

Zárójelentés

Személyi feltételek

A kutatócsoport összetétele többször módosult: a témavezető, Dr. Györgydeák Zoltán 2005. tavaszi váratlan megbetegedése, majd őszi halála miatt, Vágvölgyiné Dr. Tóth Marietta gyermekének 2004. őszi születése, majd a két éves GYES miatt csak a futamidő mintegy felében vettek részt a munkában. Kiesésüket Felföldi Nóra PhD hallgató csatlakozása 2004. szeptemberében csak részben pótolhatta. A személyi változásokat, témavezető-váltást, illetve a munkaterv részleges változását szerződés-módosításban rögzítettük.

A kutatás célja és a vállalt munkaprogram

Mind a hagyományos, mind a modern szénhidrátkémiában fontos szerep jut az anomer szénatomon különféle nitrogéntartalmú funkciós csoportokat tartalmazó alapvegyületeknek, így az *N*-glikozidoknak, glikozil-amidoknak, -imideknek, nitrovegyületeknek, izotiocianátoknak és további csoportoknak, így különösen az aminosav-szénhidrát kapcsolatot tartalmazó *N*-glikopeptideknek. A felsorolt funkciós csoportokat tartalmazó vegyületek kiindulópontját képezik az *N*-glikán típusú glikokonjugátumok előállításának. A glikokonjugátumok és mimetikumaik előállítása, és funkcióik, valamint működési mechanizmusaik tanulmányozása a sejt felületén lezajló folyamatok, és a glikozilezett fehérjék sajátságainak jobb megismeréséhez járulhat hozzá, és ezáltal az originális gyógyszertervezés egyik rohamosan fejlődő területévé vált. A pályázatban az *N*-glikopeptidek alapvető előállítási módszereihez, valamint azok szerkezeti módosításához kívántunk hozzájárulni glikozil-azidok, mint kiindulási anyagok felhasználásával az alábbi (a 2005. május 31-i szerződés-módosításban foglalt) munkaterv szerint:

1. A glikozil-azidokat (D-*glüko*, D-*galakto*, 2-acetamido-2-dezoxi-D-*glüko* konfigurációban) közvetlen úton trimetil-foszfinimidekké kívánjuk alakítani, melyek várhatóan védett aminosavakkal is amidokká alakíthatók. E körben a 2-acetamido-2-dezoxi-D-glikopiranozil-azidból megkíséreljük a „glükózamin-aszparagin” egyszerűsített előállítását.
2. Megvizsgáljuk a fenti átalakítások megvalósíthatóságát különböző dikarbonsav származékokkal.
3. Korábbi vizsgálatainkból rendelkezésre álló, az anomer centrumon az azidcsoport mellett CN, CONH₂ és COOR szubsztituenst tartalmazó acetilezett ill. benzoilezett monoszacharid származékokra is megkíséreljük kiterjeszteni az átalakítást. Ennek sikere új gliko- valamint glikopeptido-mimetikumokat eredményezhet.
4. A trimetil-foszfinimidek alkilezését aralkilhalogenidekkel és halogénecetsav-származékokkal vizsgáljuk meg. Ez utóbbi reakció az eddig ismeretlen *N*-glikopiranozilezett glicinekhez vezetne.

Az elvégzett munka és elért eredmények* munkatervi pontonként

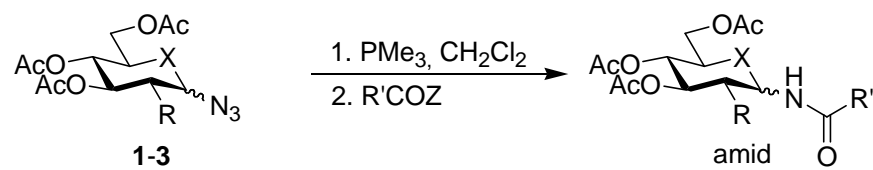
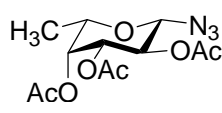
1. A munkatervi pont értelmében a per-*O*-acetilezett *N*-glikopiranozil-amidok előállítására Györgydeák Zoltán és munkatársai által kidolgozott módszert tovább általánosítottuk. Egyrészt a D-*glüko* konfigurációban újabb savakkal illetve származékaikkal (*n*-pentánsav, pivaloil-klorid, ciklohexán-karbonsav, adamantán-karbonsav, fenilecetsav, difenil-ecetsav, 3-fenil-propionsav, transz-fahéjsav, fenil-propionsav, 4-metil-benzoecetsav, 4-fenil-benzoecetsav, 1- és 2-naftoesav, 3-(2-naftil)-akrilsav) végeztük el a módosított Staudinger-körülmények (PMe₃/CH₂Cl₂ vagy PhCH₃) alkalmazásával kapott intermedier trimetil-foszfinimid acilezését, és így – az acetyl védőcsoportok Zemplén szerint végzett eltávolítása után – egy olyan amid sorozathoz jutottunk, amelyek gátló hatást mutattak a nyúl vázizomból izolált glikogén foszforiláz *b* enzimmel szemben. A legjobb gátló hatást az *N*-(β-D-glikopiranozil)-3-(2-naftil)-akrilamid mutatta ($K_i = 3.5 \mu\text{M}$). A szintetikus munka és az enzimkinetikai mérések leírását, valamint a szerkezet–hatás összefüggések elemzését publikáltuk.¹
- Másrészt a monoszacharid változtatásával a per-*O*-acetilezett 2-acetamido- (**1β**) és a 2-

* A végzett munka jelentős részét nemzetközi folyóiratokban közzétettük. Ezek a közlemények tartalmazzák az adott téma kutatásának előzményeit, és az elért új eredmények részletes bemutatását. Ezekre a folyóiratcikkekre a szokásos módon hivatkozunk. A zárójelentésben csak azokat a témákat fejtjük ki, amelyek nyomtatott formában még nem kerültek közlésre.

ftálimido-2-dezoxi-D-glükopiranozil-azid (**2 $\alpha\beta$**), az 5-tio-D-glükopiranozil-azid (**3 $\alpha\beta$**) és a β -L-fukopiranozil-azid (**4**) analóg átalakításait végeztük el (1. Táblázat).

Megvalósítottuk a „glükózamin-aszparagin” egyszerűsített előállítását is.¹

1. Táblázat: N-Glükopiranozil-amidok előállítása

					
Kiindulási azid			Acilezőszer		Hozam [%] (amid konfigur.)
	X	R	R'	Z	
1β	O	NHCOCH ₃	CH ₃	OH	69 (β)
			CH ₃	OCOCH ₃	68 (β)
			Ph	OH	43 (β)
			3,4,5-C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃	Cl	67 (β)
			CF ₃	OCOCF ₃	77 (β)
			n-C ₁₁ H ₂₃	Cl	91 (β)
			C ₁₀ H ₇ (2-naftil)	Cl	54 (β)
2β	O	NPhth	CF ₃	OCOCF ₃	78 (β)
			C ₁₀ H ₇ (2-naftil)	OH	75 (β)
2α	O	NPhth	CF ₃	OCOCF ₃	98 (β)
			C ₁₀ H ₇ (2-naftil)	OH	72 ($\alpha\beta$)
3α	S	OAc	CH ₃	OH	44 ($\alpha\beta$)
3α	S	OAc	Ph	OH	27 ($\alpha\beta$)
4			CH ₃	OCOCH ₃	76 (β)
			C ₁₀ H ₇ (2-naftil)	OH	94 (β)

A fenti módszerrel elkészített *N*-acetyl- β -D-glükopiranozilamin és *N*-trifluoracetyl- β -D-glükopiranozilamin nyúl vázizom glikogén foszforilázzal képzett komplexeinek kristallográfiai vizsgálata alapján magyarázatot adtunk a két vegyület gátlásának erősségében mutatkozó mintegy kétszeres eltérésre.²

- A 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil azidból az előző pontban használt Staudinger-körülményeket alkalmazva elkészítettük a megfelelő trimetil-foszfinimidet, melyet *in situ* reagáltattunk alifás és aromás dikarbonsavakkal, illetve származékaikkal. A disavak és származékaik megfelelő *N*-glükopiranozil monoamidjait a következő reagensekkel kaptuk: pentán-1,5-disav, hexán-1,6-disav; szukcinimid, illetve glutárimid majd

gyűrűnyitás NaOMe-dal; maleinsav, acetilén-dikarbonsav, maleinsav-monoetilészter; ftálsavanhidrid, izo- és tereftálsav-monometilészter. A kapott származékokat átalakítottuk dikarbonsav monoamidokká, illetve dikarbonsav-metilészter-amidokká. Az acetil védőcsoportok ezen átalakítások egy része közben eltávoztak, illetve a Zemplén-módszerrel eltávolítottuk őket. Ily módon 12 nem védett vegyülethez jutottunk, melyeket megvizsgáltunk glikogén foszforiláz gátló hatásra. A sorozatban több hatástalan vegyület mellett egy jó gátló hatású származék is volt: a 3-(*N*-β-D-glükopiranozil-karbamoil)propánsav inhibitorállandója az alacsony mikromólos tartományba esik ($K_i = 20 \mu\text{M}$). E munka során megmutattuk, hogy a módosított Staudinger-körülményeket dikarbonsavakkal és származékaikkal is lehet alkalmazni, illetve bővítettük a glikogén foszforiláz glükóz analóg gátlószereinek szerkezet-hatás összefüggéseit. A munkát publikáltuk.³

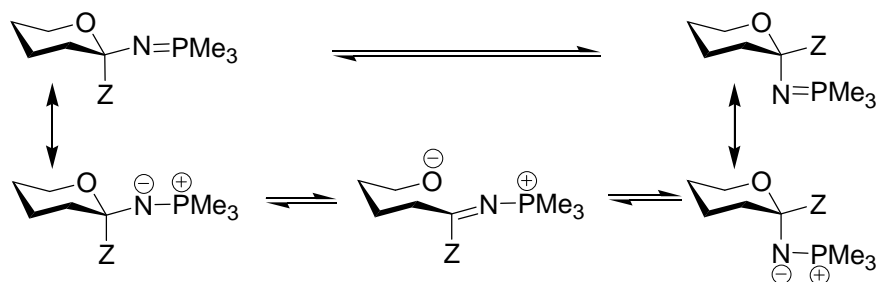
3. A per-*O*-acilezett (β-D-hex-2-ulopiranozil-azid)onsav-származékok körét a korábbi vizsgálatok során nyert nitrilek (**5**, **6**), amidok (**7**, **8**) és metilészterek (**9**, **10**) mellett kibővítettük a megfelelő terc.-butil- (**11**, **12**) és triklóracetil-észterekkel (**13**, **14**) (a pentaklórfenil-észter megkísérelt előállításánál a megfelelő glikozil-bromid azidsubstitúciója során bomlást tapasztaltunk), valamint glicinamidokkal (**15**, **16**) (2. Táblázat). A megfelelő savazidon keresztül elkészítettük a **15** amid α anomerjét is.⁴ E vegyületek körében térképeztük fel a módosított Staudinger-körülmények alkalmazhatóságát az azidcsoport amiddá alakítására.
- Az **5** és **6** nitrilek, illetve a **7** és **8** amidok esetén savkloridok jelenlétében bomlást tapasztaltunk. A **8** amidból acilezőszer távollétében megkaptuk a megfelelő **17** trimetil-foszfinimid anomereket. Míg a **9** észterből savkloridok jelenlétében nem sikerült jellemezhető anyagot izolálnunk, a benzoilezett **10** esetén az alkalmazott acetil-klorid mennyiségétől és a hőmérséklettől függően eltérő arányban kaptuk a **20** acetil-triazént és a **21** és **22** amid anomereket. A **15** glicinamidból komplex termékelegyet kaptunk, amelyekből az alkalmazott acilezőszer függvényében változó arányban kaptuk meg a **18** és **19** anomerek keverékét: acetil-kloriddal szobahőmérsékleten és $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on is ~10 % **18** és ~22-24 % **19** volt izolálható. Ecetsavanhidriddel $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on 51 % **19**-et kaptunk, míg ecetsavat alkalmazva ugyanezen hőmérsékleten egy részlegesen dezacetilezett származékot különítettünk el 31 %-os hozammal, melynek újraacetilezése **19**-et

szolgáltatta.

2. Táblázat: A vizsgált per-*O*-acilezett (D-hex-2-ulopiranozil-azid)onsav-származékok és az izolált vegyületek

	R					
	CN	CONH ₂	CO ₂ Me	CO ₂ tBu	CO ₂ CH ₂ CCl ₃	CONHCH ₂ CO ₂ Me
	5	7	9	11	13	15
	6	8	10	12	14	16
	17					
	20					
	21		22			

E tapasztalatok fényében valószínűsíthető, hogy a trimetil-foszfínimid képzés megtörténik a glikozilazid-onsav származékok esetében is, azonban ennek anomerizációja az acilezéssel összemérhető sebességgel megy végbe. A fokozott anomerizációs hajlam a Z = CN, CONH₂, CO₂Me csoportok jelenlétében a gyűrűnyílás során kialakuló konjugatív stabilizációnak tulajdonítható:



Az észlelt komplex termékegyek kialakulása is ennek az anomerizációnak és a folyamat során fellépő többféle nukleofil részecske reakciójának eredménye lehet. Mindezek alapján megállapítható, hogy a módosított Staudinger-körülmények alkalmazása a per-*O*-acilezett (β -D-hex-2-ulopiranozil-azid)onsav-származékok körében a reakció nem megfelelő szelektivitása miatt kevésbé alkalmas a megfelelő *N*-glikozil-amidok előállítására.

4. Egyéb elektrofilek alkalmazhatóságát a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-azidból nyert trimetil foszfinimiddel vizsgáltuk meg. Benzil-kloriddal végzett reakcióban sok foltos termékegyet kaptunk, amelyből nem tudtunk jellemezhető anyagot izolálni. A halogénecetsav származékok közül klór- és brómcetsavval, ezek etil-észtereivel, illetve brómacetyl-bromiddal végeztünk kísérleteket. A savakkal, illetve a brómacetyl-bromiddal mérsékelt, ~40-50 %-os hozammal a megfelelő *N*-glükopiranozil-halogénacetamidokat kaptunk meg, a tisztítás minden esetben oszlopkromatográfiát igényelt. Az észterek reakcióiban komplex elegyeket kaptunk. Egyik esetben sem találtuk meg a várt *N*-glükopiranozil-glicin származékokat. Mivel a védett *N*-glükopiranozil-halogénacetamidokat a glükozil-azid redukcióját követő acilezéssel a két lépésre is jobb hozammal és egyszerűbb tisztítással (kristályosítással) lehet elkészíteni, a Staudinger-protokol alkalmazása ezen a területen nem előnyösebb.

További elektrofil reagensként kipróbáltunk szulfonil-klorid származékokat is. Benzol-, illetve *p*-toluol-szulfonil-kloriddal reagáltatva a fenti foszfinimidet a megfelelő *N*-glükopiranozil-szulfonamidokat kaptunk kristályosítással izolálva mintegy 20-30 %-os hozammal. A klórszulfonil-izocianát és *p*-toluolsav reakciójában nyerhető *N*-*p*-toluol-szulfonil-kloriddal is megvizsgáltuk a trimetil-foszfinimid átalakítását, azonban csak komplex elegyek keletkezését figyeltük meg, amelyek nem szolgáltatták a várt terméket. Spirociklizációs reakciókhoz, glükopiranozilidén-spiro-oxadiazolin származékok tervezett előállításához szükségünk volt per-*O*-acetylzett *N*- β -D-glükopiranozil-amidoximokra. Mivel ezek elkészítése a megfelelő glikozil-amin és hidroximoil-klorid, illetve glikozil-bromid és amidoxim reakciójával nem sikerült, megvizsgáltuk a trimetil-foszfinimid acilezését hidroximoil-kloridokkal. Ezen az úton mintegy 60 %-os hozammal nyertük az eddig ismeretlen *N*-glükopiranozil-benzamidoximot, és a 4-nitro- valamint 4-ciano-szubsztituált származékokat.

Munkaterven kívüli eredmények

- Egy új problémakör tanulmányozása – nevezetesen heterociklusba zárt aminoguanidin-részszerkezetet tartalmazó származékok, mint hidrazonok reakcióinak vizsgálata egyszerű monoszacharidokkal – a modellreakciók elvégzése és elemzése⁵ után Györgydeák Zoltán eltávozása miatt sajnálatosan torzóban maradt.
- Elkészült és megjelent a glikozil-azidok előállítását és transzformációit a legteljesebben áttekintő 80 oldal terjedelmű, több mint 350 hivatkozást tartalmazó könyvfejezet.⁶

Hasznosítási lehetőségek

Az alap kutatás célja a szintetikus metodológia fejlesztése volt, amelynek során olyan *N*-glükopiranozil-amidok is készültek, melyek hatékony glikogén foszforiláz (GP) gátlószereknek bizonyultak. Mivel a GP inhibitorait intenzíven vizsgálják egy potenciális antidiabetikus terápia kidolgozására, az előállított vegyületek továbbfejlesztése indokolt lehet.

Debrecen, 2006. február 15.

Dr. Somsák László
egyetemi tanár
témavezető

A hivatkozott közlemények:

- (1) Györgydeák, Z.; Hadady, Z.; Felföldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Tóth, M.; Brunyánszky, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. Synthesis of N-(β -D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 4861-4870.
- (2) Anagnostou, E.; Kosmopoulou, M. N.; Chrysina, E. D.; Leonidas, D. D.; Hadjiloi, T.; Tiraidis, C.; Zographos, S. E.; Györgydeák, Z.; Somsák, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Kolisise, F. N.; Oikonomakos, N. G. Crystallographic studies on two bioisosteric analogues, N-acetyl- β -D-glucopyranosylamine and N-trifluoroacetyl- β -D-glucopyranosylamine, potent inhibitors of muscle glycogen phosphorylase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 181-189.
- (3) Czifrák, K.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P.; Schmidt, J.; Wessjohann, L. A.; Somsák, L. Synthesis of N-(β -D-glucopyranosyl) monoamides of dicarboxylic acids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 947-956.
- (4) Czifrák, K.; Szilágyi, P.; Somsák, L. Anomeric α -azido acid (2-azido-2-deoxy-hept-2-ulopyranosonic acid) derivatives en route to peptides incorporating sugar amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 127-141.
- (5) Szilágyi, L.; Illyés, T. Z.; Györgydeák, Z.; Szabó, G.; Karácsony, A. Syntheses of partially hydrogenated [1,2,4] triazolo[4,5-a] pyrimidine-4-ones through cyclisation of 2-arylidenehydrazino-6-methyl-4-pyrimidones. *Arkivoc* **2004**, 243-252.
- (6) Györgydeák, Z.; Thiem, J. Synthesis and transformation of glycosyl azides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol 60, 2006; pp 103-182.